

بررسی تغییرات قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت ها طی گنادوژنز در موش صحرایی به روش لکتین هیستوشیمیایی

فاطمه نیکمرد، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: NikmardF@mums.ac.ir

*دکتر علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان: استادیار علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران (*نویسنده مسئول). Email: Ebrahimzadehba@mums.ac.ir

دکتر علیرضا محمودیان: استادیار علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: MahmodianA@mums.ac.ir

الهام محمد زاده: دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: MohammadzadehE871@mums.ac.ir

دکتر علیرضا فاضل: استاد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: FazelA@mums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۵

چکیده

زمینه و هدف: تشکیل گناد ها حاصل فرایند های پیچیده تکاملی است. از طرفی فرایند های تکاملی توسط میان کنش های مولکولی متعددی از جمله قندهای انتهایی گلیکوکونژوگیت ها ی موجود در سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی تنظیم می شود. لذا این مطالعه به منظور بررسی بیان قندهای انتهایی گلیکوکونژوگیت ها و تغییرات آن ها طی گنادوژنز در رت انجام شد.

روش کار: این مطالعه که از نوع توصیفی- آزمایشگاهی است انجام شد. در این پژوهش تعداد ۳۰ سر جنین رت نژاد ویستار در روزهای ۱۴، ۱۶ و ۱۷ حاملگی در فرمالین فیکس و پس از پاساژ بافتی در پارافین قالب گیری، و برش هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و با استفاده از لکتین های Arachis hypogaea (peanut)، Maclura pamiifera agglutinin (MPA)، Lotus tetragonolobus agglutinin، که با HRP کوئوگه شده بودند و به ترتیب برای شناسایی قند های انتهایی D-Gal(β1-3) DGalNAC و Gal(β1-3)GalNAC و L-Fuc(α1→4)GlcNAC اختصاصی هستند، رنگ آمیزی شدند. سپس شدت رنگ مقاطع میکروسکوپی برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی به روش کور تعیین و نمونه ها رتبه بندی شدند. در انتها اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال والیس و نرم افزار SPSS باهم مقایسه گردیدند.

یافته ها: یافته ها نشان داد که گناد های در حال تکامل در روز دوازدهم جنینی با LTA واکنشی ملاحظه نگردید. در حالیکه روز چهاردهم ماتریکس خارج سلولی با لکتین مذکور واکنش نشان داد ($p < 0.05$). در روز شانزدهم جنینی سلول های جنسی اولیه، ماتریکس خارج سلولی و سلول های اپیتلیالی با لکتین LTA واکنش نشان دادند ($p < 0.05$). واکنش تعدادی از سلول های اپیتلیالی و مزانشیمی گناد در حال تکامل در روز دوازدهم جنینی با لکتین MPA قابل مشاهده بود. به علاوه در روز چهاردهم ماتریکس خارج سلولی، اپیتلیال سطحی با لکتین مذکور واکنش نشان دادند ($P < 0.05$). در روز شانزدهم سلول های جنسی اولیه، سلول های اپیتلیالی با لکتین MPA واکنش نشان دادند ($p < 0.05$). لکتین PNA با گناد های در حال تکامل در روز دوازدهم هیچگونه واکنشی بروز نداد در صورتی که در روز چهاردهم با سلول های جنسی اولیه واکنش نشان داد ($p < 0.05$). و در روز شانزدهم با سلول های جنسی اولیه، ماتریکس خارج سلولی و سلول های اپیتلیوم سطحی واکنش نشان داد، به طوری که شدت رنگ نسبت به روز چهاردهم معنی دار بود ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: طبق یافته های این پژوهش می توان نتیجه گرفت که بیان و تغییرات گلیکوکونژوگیت ها با قند های انتهایی L-Fuc و Gal(β1-3)GalNAC و D-Gal(β1-3)DGalNAC در طی گنادوژنز تنظیم شده است.

کلیدواژه ها: گنادوژنیز، تکامل، گلیکوکونژوگیت ها، لکتین،

مقدمه

گناد ها در طی تکامل جنینی ابتدا به صورت یک زوج ستیغ تناسلی طولی که حاصل تکثیر اپیتلیوم سلومی و متراکم شدن مزانشیم زیرین آن است، ظاهر می گردند. به علاوه سلول های جنسی اولیه (PGCs) که از اپی بلاست منشاء می گیرند در طول شیار اولیه مهاجرت نموده، در میان سلول های آندودرمی دیواره کیسه زرده در مجاورت آلاتوئیس جا می گیرند^(۱). در جنین های رت این سلول ها در روز دهم جنینی در اندودرم دیواره کیسه

گناد ها در طی تکامل جنینی ابتدا به صورت یک زوج ستیغ تناسلی طولی که حاصل تکثیر اپیتلیوم سلومی و متراکم شدن مزانشیم زیرین آن است، ظاهر می گردند. به علاوه سلول های جنسی اولیه (PGCs) که از

در داخل و اطراف طناب های اپیتلیالی گندهای اولیه مستلزم تکامل و تمایز طبیعی گناد ها در پستانداران محسوب می گردد^(۳). با این وجود پیدایش، تغییرات و ناپدید شدن احتمالی این ترکیبات و ارتباطات آن ها با شکل گیری گناد ها کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. از طرفی چون لکتین ها، پروتئین یا گلیکوپروتئین های غیر ایمونولوژیک هستند که به طور اختصاصی با قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت ها متصل می شوند، وسیله ای مناسب برای شناسایی این ترکیبات محسوب می گردند^(۱۲). لذا این مطالعه با هدف بررسی تغییرات برخی از قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت در سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی در طی گنادزنگاری با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی انجام شد.

روش کار

این مطالعه که از نوع توصیفی - آزمایشگاهی است به منظور شناسایی قند های انتهایی در مراحل مختلف جنینی با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی انجام شد. در این مطالعه از تعداد ۴۰ سر رت نژاد ویستار (۳۰ رت ماده و ۱۰ رت نر) با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم که از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تهیه شده بودند، استفاده گردید. این حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات با دسترسی آزادانه به آب، غذا (روزانه دو بار صبح و عصر توسط پلیت تغذیه می شدند)، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته (از ساعت ۸ صبح تا ساعت ۸ بعدازظهر)، درجه حرارت ۲۴-۱۸ درجه سانتی گراد و رطوبت مناسب نگهداری و در طی مراحل تحقیق دستورالعمل The National Institutes of Health (NIH) و Welfare Department of Health Education & (DHEW)^۲ برای مراقبت از حیوانات مورد توجه و اجرا گردید. پس از آداپتاسیون به نسبت ۱ به ۳ در قفس های مخصوص جفت گیری قرار گرفتند و با تهیه اسمیر واژینال و مشاهده اسپرم روز صفر حاملگی تعیین و رت های حامله در قفس های جداگانه نگهداری شدند. در روزهای دوازدهم، چهاردهم و شانزدهم رت های حامله تحت بیهوشی با کلروفرم قرار گرفتند و با عمل سزارین جنین ها از رحم خارج گردید. سپس جنین ها از پرده های جنینی خارج و در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند.

زرد و در روز دوازدهم جنینی در مزانتر خلفی روده یا در مزانشیم بین روده و ستیغ های تناسلی یافت می شوند، به طوری که در روز سیزدهم بیشتر PGCs در ستیغ تناسلی قرار دارند و در روز چهاردهم تقریباً تمام PGCs به ستیغ های تناسلی می رسند^(۲). کمی قبل از رسیدن PGCs به ستیغ های تناسلی، اپیتلیوم ستیغ تناسلی تکثیر یافته و به مزانشیم زیرین خود نفوذ می کند و به همراه PGCs طناب های جنسی اولیه را به وجود می آورند، به طوری که ستیغ های تناسلی اولیه در این مرحله گناد های تمایز نیافته نامیده می شوند. در صورتی که PGCs به ستیغ های تناسلی نرسند گندها تکامل نمی یابند، بنابراین، وجود PGCs بر تکامل گناد ها و تبدیل آن ها به تخمدان و یا بیضه ضرورت داشته و احتمالاً دارای اثرات القائی می باشند^(۴,۳).

فرایندهای تکامل جنینی، من جمله تکامل گناد ها تحت تاثیر کنش های متقابل سلول با سلول و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی صورت می گیرد. این میان کنش ها توسط مولکول های متعددی میانجی گری و هدایت می شوند^(۵,۶). از جمله مولکول های موثر در این فرایندها، گلیکوکانژوگیت های سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی هستند. در این میان، قند های انتهایی زنجیره های قندی گلیکوکانژوگیت ها در روند ارتباطات و میان کنش سلول های جنینی با محیط خود نقش به سزایی داشته، موجب می شود سلول ها وارد مراحل پیچیده مورفونیک گشته و مسیر طبیعی تکامل و تمایز خود را طی می کنند^(۷). میان کنش کربوهیدرات با کربوهیدرات به عنوان سیگنال های حین امبریونز یا ارگانوژن شناخته شده اند^(۸). نظر به این که گلیکوکانژوگیت های سطح سلول ها در فرایندهای تکاملی از قبیل شناسایی، مهاجرت و میان کنش های سلولی نقش کلیدی دارند^(۹,۱۰) و در این راستا بخش کربوهیدراتی این ترکیبات در طی تمایزات سلولی دچار تغییر می شوند^(۱۱). از طرف دیگر تکامل گندها که یکی از فرایندهای پیچیده تکاملی محسوب می شود، حاصل میان کنش های متعدد سلولی و مولکولی می باشد و از جمله مولکول هایی که ممکن است در این میان کنش ها دخالت داشته باشد قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت ها می باشند. در این راستا اگرچه ممکن است در گندهای در حال تکامل در هر دو جنس انواع کربوهیدرات ها شبیه باشند، ولی الگوی ظهور، توزیع و تغییرات این ترکیبات

جدول شماره ۱- اسامی و مشخصات لکتین ها

Carbohydrate binding specificity	abbreviation	Lectin
Gal-($\beta 1 \rightarrow 3$) GalNAc	MPA	Maclura pamifera Aagglutinin
L-fuc($\alpha 1 \rightarrow 4$)GlcNAc	LTA	Lotus tetragonolobus Aagglutinin
D-Gal-($\beta 1 \rightarrow 3$)-D-Gal NAc	PNA	Arachis hypogaea Agglutinin

۱۰۰ میلی لیتر PBS) و آب اکسیژنه (۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی لیتر محلول DAB) مجاور شدند. پس از آن مقاطع بافتی با آب جاری شستشو و برای ایجاد رنگ زمینه از رنگ آمیزی آل‌سین بلو (pH: ۲/۵) به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. مقاطع مورد نظر با درجات افزایشی الکل آبگیری و با گزین شفاف سازی و سپس بر روی لام چسبانده شدند. لازم به ذکر است که یک لام نمونه، حاوی بافت های مختلف (Composite) به عنوان کنترل مثبت با هر لکتین رنگ آمیزی شد. در این روش در محل اتصال لکتین های کونژوگه شده با HRP با قند انتهایی اختصاصی خود، رنگ قهوه ای ظاهر می شود که نتیجه واکنش HRP با DAB است^(۱۳، ۱۴).

نمونه های آماده شده توسط سه نفر به صورت کور Blind با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و شدت واکنش برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی با استفاده از طیف لیکرت مطابق جدول ۲ تعیین گردید (عدم واکنش =۰ واکنش ضعیف = + واکنش متوسط ++ واکنش شدید +++ و واکنش بسیار شدید ++++). سپس اطلاعات به دست آمده برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی با استفاده تست آماری کروسکال والیس و نرم افزار SPSS باهم مقایسه گردیدند، سپس از نمونه های مورد نظر توسط میکروسکوپ دوربین دار Olympus مدل BX51 تصویر تهیه گردید^(۱۳).

یافته ها

بررسی مقاطع میکروسکوپی مربوط به روز های مختلف جنینی نشان داد که تکامل گناد ها در رت از روز دهم جنینی به صورت دو ستیغ تناسلی طولی ظاهر می گردند و PGCs در طی روزهای دوازدهم تا چهاردهم جنینی، از دیواره کیسه زرده به سمت ستیغ های تناسلی در طول مزانتتر خلفی مهاجرت می نمایند. بطوریکه از روز سیزدهم در اپیتلیوم و مزانشیم گناد های در حال تکامل قابل ملاحظه می باشند.

جنین های به دست آمده در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند و بعد از فیکساسیون، نمونه ها به روش معمول آزمایشگاه بافت شناسی توسط الکل اتیلیک با غلظت های افزایشی آبگیری و سایر مراحل آماده سازی بافتی انجام شد. سپس نمونه ها در بلوک های پارافینی قالب گیری و برش های عرضی به ضخامت ۵ میکرومتر به منظور یافتن مقاطع بافتی مناسب و حاوی گناد های در حال تکامل، به صورت سریال توسط میکروتوم مدل Leitz¹⁵¹² تهیه گردید.

برای رنگ آمیزی با لکتین ها، در هر مرحله جنینی تعداد ۱۵ مقطع از برش های سریالی که حاوی بافت های گنادی بودند به طور تصافی انتخاب و با روش معمول آزمایشگاه بافت شناسی مراحل آب دهی انجام شد. برای انجام این مراحل، به ترتیب برش های بافتی داخل محلول گزین و درجات نزولی الکل (۱۰۰٪، ۹۰٪، ۷۰٪ و ۵۰٪) و در نهایت آب مقطر قرار داده شدند. به این ترتیب که نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بافر فسفات نمکی (PBS) قرار داده شدند و سپس به منظور خنثی کردن آنزیم پراکسیداز داخلی Endogenous، لام ها به مدت ۴۵ دقیقه در آب اکسیژنه ۱٪ محلول در PBS در شرایط تاریکی قرار داده شدند. سپس لام ها به سه گروه ۵ تایی تقسیم و هر پنج لام به طور جداگانه با هر یک از لکتین ها با غلظت نهایی ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در محیطی مرطوب انکوبه شدند. در این پژوهش از لکتین های LTA (Cat. N. L-5759)، Cat. N. M- (3267) و MPA (Cat. N. L-7759) که با HRP نشاندار و از شرکت سیگما تهیه شده بودند استفاده گردید (جدول ۱).

در مرحله بعد برای حذف لکتین های اضافی نمونه ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۰/۰۳ درصد دی آمینوبنزدین DAB (Diaminobenzedin) (۰/۰۳ گرم دی آمینوبنزدین در

جدول شماره ۲: رتبه بندی شدت واکنش سلول ها و نواحی مختلف گناد با لکتین های مورد استفاده در این پژوهش در روزهای مختلف جنینی

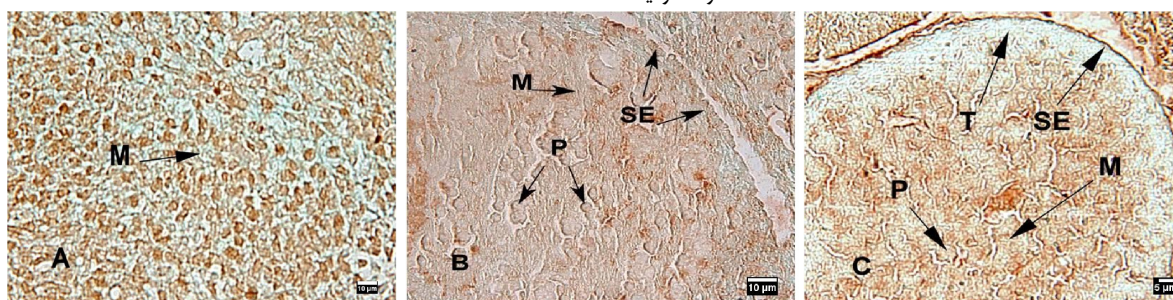
	<i>PGC_s</i>			<i>Matrix</i>			<i>Epithelial cells</i>			<i>Mesenchyme</i>		
Day lectin	E ₁₂	E ₁₄	E ₁₆	E ₁₂	E ₁₄	E ₁₆	E ₁₂	E ₁₄	E ₁₆	E ₁₂	E ₁₄	E ₁₆
LTA	-	-	+	-	+	++	-	-	+++	-	-	-
MPA	-	-	+	-	+	-	+	+	+++	+	+	+
PNA	-	+	++	-	-	+	-	-	++	-	-	+

در این مرحله واکنش ضعیفی را نشان داد ($P < 0.05$). سایر نواحی از جمله اپی تلیوم سطحی (SE) و مزانشیم زیرین آن، که بدون حدود مشخصی در امتداد با ماتریکس قرار دارد، با لکتین LTA واکنشی بروز ندادند (شکل 1-B).

در روز شانزدهم جنینی تغییر ساختار گناد به وضوح قابل مشاهده بود به طوری که PGC_s در دسته های سلولی منظم قرار گرفته و واکنش ضعیفی در این سلول ها ظاهر گردید ($p < 0.05$). ماتریکس خارج سلولی در ناحیه مرکزی واکنش متوسطی را نشان دادند که در مقایسه با روز چهاردهم واکنش شدیدتر بود ($p < 0.05$). اپی تلیوم سطحی که به صورت لایه نازکی در سطح گناد قرار قابل مشاهده بود، واکنش شدیدی را در این مرحله از تکامل با لکتین LTA نشان داد ($p < 0.05$). ناحیه زیرین اپی تلیوم، بافت همبندی به صورت متراکم قابل مشاهده بود که با لکتین LTA واکنش قابل

بر اساس شدت واکنش ایجاد شده در روش لکتین هیستوشیمیایی (جدول ۲) و لکتین های مورد استفاده (جدول ۱) مشخص شد که در روز دوازدهم جنینی ستیغ های تناسلی به صورت ابتدایی و سازمان نیافته دیده می شوند و در واکنش با لکتین LTA، سلولی که واجد ویژگی های PGC_s باشد در ستیغ های تناسلی مشاهده نگردید. ماتریکس خارج سلولی (M)، که به میزان کمی وجود دارد، بدون واکنش با لکتین مذکور قابل مشاهده بودند. هسته سلول هایی که ظاهری مزانشیمی داشتند و به صورت یکنواخت در گناد پراکنده بودند واکنش ضعیفی با لکتین LTA بروز دادند. در سایر نواحی گناد های در حال تکامل در این مرحله واکنش قابل ملاحظه ای مشاهده نشد (شکل 1-A). در روز چهاردهم جنینی در مقایسه با روز دوازدهم PGC_s (P) در گناد ها قابل مشاهده بودند و لی با لکتین LTA واکنشی نشان ندادند. ماتریکس خارج سلولی (M)

شکل ۱: فتومیکروگراف های مربوط به گناد در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین LTA قرار گرفته و از آلین بلو ($pH=2.5$) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.



شکل 1-A: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۲ روزه رت را نشان می دهد. ماتریکس خارج سلولی (M) که در تصویر با پیکان مشخص شده است با لکتین LTA واکنش نشان نداده است در صورتیکه هسته سلول ها واکنش ضعیفی را با لکتین مذکور بروز داده اند (Scale bar = 10 μm).

شکل 1-B: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۴ روزه رت می باشد که در این مرحله از تکامل PGC_s ها در گناد ها قابل مشاهده اند (P) ولی با لکتین LTA واکنش نشان ندادند. ماتریکس خارج سلولی (M) واکنش ضعیفی را نشان می دهد و سایر نواحی مشخص از جمله اپی تلیوم سطحی (SE) و مزانشیم زیرین (Mes) بدون واکنش دیده می شوند (Scale bar = 10 μm).

شکل 1-C: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۶ روزه را نشان می دهد. دسته های سلولی PGC_s (P) که در تصویر مشخص شده اند واکنشی ضعیف، ماتریکس خارج سلولی (M) واکنشی متوسط و اپی تلیوم سطحی (SE) در تصویر فوق بصورت یک لایه نازک در سطح گناد واکنش شدیدی را نشان می دهند. بافت همبند (T) زیر ناحیه اپی تلیوم سطحی (تونیکا آلبوزینه) بدون هیچ واکنشی دیده می شوند. (Scale bar = 5 μm).

ملاحظه ای بروز نداد (شکل 1-C).

در ارزیابی مقاطع مربوط به جنین های دوازده روزه که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته بود حضور PGCs کاملاً مشهود نبود زیرا در این مرحله تکاملی، این سلول ها به ستیغ های تناسلی نرسیده اند و در نتیجه مدرکی دال بر واکنش این سلول ها با لکتین مذکور مشاهده نگردید. در این مرحله از تکامل سلول هایی به صورت پراکنده دیده می شوند که هسته آنها واکنش ضعیفی نیز با لکتین MPA نشان می دهند. سلول های اپی تلیوم سطحی ستیغ ها واکنش نسبتاً ضعیفی با لکتین مذکور نشان دادند (شکل 2-A).

در بررسی گناد ها در روز چهاردهم جنینی، ساختار این ارگان تقریباً سازمان یافته قابل مشاهده بود و در بررسی واکنش این ارگان در حال تکامل با لکتین MPA مشخص شد که PGCs با لکتین مذکور واکنش ندادند و ماتریکس خارج سلولی در این مرحله بر خلاف روز دوازدهم واکنش ضعیفی را بروز دادند ($p < 0.05$) در صورتیکه سلول های اپی تلیوم سطحی مانند روز دوازدهم واکنش ضعیفی نشان دادند. هم چنین ظهور واکنش در مزانشیم زیرین در این روز به صورت واکنش ضعیفی شروع گردید ($p < 0.05$). در واقع سه ناحیه ماتریکس، اپی تلیوم سطحی و مزانشیم زیرین به صورت یکنواخت با لکتین مذکور واکنش نشان دادند (شکل 2-

(B).

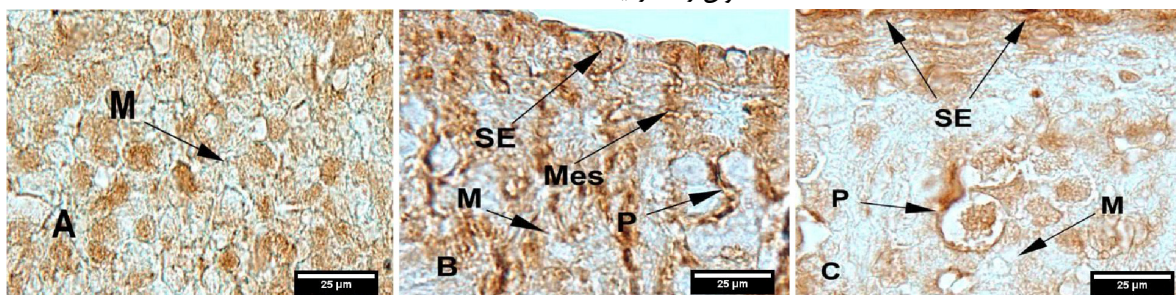
در روز شانزدهم جنینی PGCs برای اولین بار در مقایسه با روز های دوازده و چهارده جنینی با لکتین MPA واکنش ضعیفی را نشان دادند ($p < 0.05$). واکنش ماتریکس خارج سلولی در مقایسه با روز چهارده کاهش یافت ($p < 0.05$). اپی تلیوم سطحی چند لایه واکنش شدیدی را نشان دادند که در مقایسه با روز دوازده و چهارده از افزایش چشمگیری برخوردار بود ($p < 0.05$). در این مرحله مزانشیم زیرین، ناحیه ای که عمدتاً در تشکیل تونیکا آلبوژینه شرکت خواهد نمود و سایر سلول ها واکنش ضعیفی بروز دادند (تصویر 2-C).

در ارزیابی مقاطع عرضی گناد ها در جنین های دوازده روزه که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته اند، هیچ گونه واکنشی در PGCs و سایر سلول های گنادی و ماتریکس خارج سلولی مشاهده نگردید (3-A).

در بررسی مقاطع مربوط به روز چهاردهم جنینی که با لکتین PNA رنگ آمیزی شده بودند، PGCs به صورت تجمعات سلولی قابل مشاهده بودند که با لکتین مذکور واکنش بسیار ضعیفی نشان دادند ($p < 0.05$) به طوری که تنها حدود سلول با این رنگ آمیزی قابل مشاهده است. سلول های دیگر موجود در گناد ها و ماتریکس خارج سلولی واکنشی با لکتین مذکور نشان ندادند (3-B).

در بررسی مقاطع مربوط به روز شانزده جنینی در

شکل ۲: فوتومیکروگراف های مربوط به گناد در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته و از آلسین بلو ($pH=2.5$) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.



شکل 2-A: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۲ روزه رت را نشان می دهد که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. سلول های پراکنده در تصویر در این مرحله از تکامل واکنش ضعیفی را نشان می دهند. بعلاوه اینکه احتمالاً PGCs در این مرحله از تکامل در گناد وجود ندارند در نتیجه واکنشی در رابطه با این سلول ها با لکتین مذکور مشاهده نمی شود. سلول های اپی تلیوم سطحی (SE) در این تصویر با واکنش ضعیفی قابل مشاهده هستند (Scale bar = 25µm).

شکل 2-B: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۴ روزه رت را نشان می دهد که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. همانطور که در تصویر ملاحظه می گردد، PGCs با لکتین مذکور واکنش نشان ندادند. ماتریکس خارج سلولی (M)، اپی تلیوم سطحی (SE) و مزانشیم زیرین آن بصورت یکنواخت واکنش ضعیفی را بروز دادند. (Scale bar = 25µm)

شکل 2-C: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۶ روزه رت را نشان می دهد. PGCs بصورت سلول های بزرگی دیده می شود (P) در سطح این سلول ها واکنش ضعیفی ملاحظه می گردد در حالیکه در ماتریکس خارج سلولی (M) واکنشی دیده نمی شود. سایر سلول ها در این تصویر واکنش ضعیفی را نشان می دهند. اپی تلیوم سطحی (SE) با واکنش نسبتاً شدیدی در تصویر قابل مشاهده است (Scale bar = 25µm).

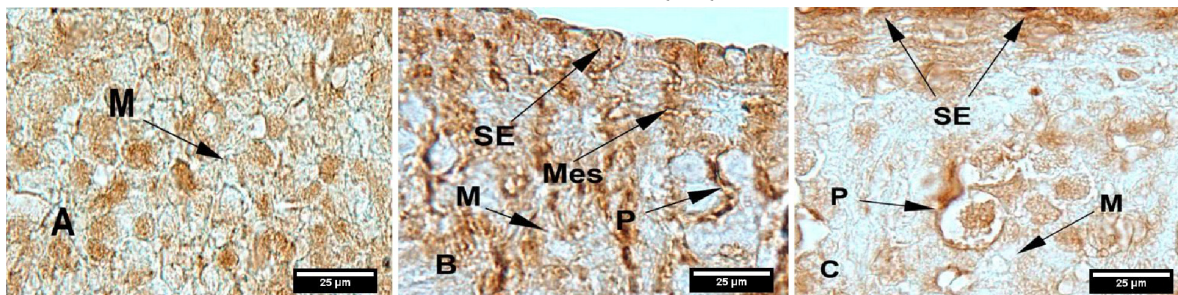
می‌نمایند، در تکامل و تمایز گناد ها نقش منحصر به فردی دارند^(۱۵). از طرف دیگر، فرایند های تکاملی توسط میان کنش های متعدد مولکولی از جمله قندهای انتهایی گلیکوکانزوگیت ها و گلیکوپروتئین ها موجود در سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی تنظیم می گردد. در این راستا، برای بروز به موقع تمایزات پیچیده سلولی، میان کنش های سلول ها با یکدیگر و با ماتریکس خارج سلولی، برخی از مولکول های شیمیایی در مراحل خاص تکاملی ظاهر شده، سپس تغییر می نمایند و احتمالاً ناپدید می شوند^(۱۶). به طوری که عدم توازن کنش های سلول-سلول و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی در مراحل مختلف مورفولوژیک موجب ایجاد حالت های پاتولوژیک و نقایص مادر زادی شده و یا بروز عوارض پاتولوژیک به ویژه ایجاد تغییرات نئوپلاستیک می شود^(۱۷). تکامل و تمایز گناد ها در پستانداران مستلزم تغییراتی در نوع و توزیع پروتئین ها و گلیکوپروتئین ها در داخل و اطراف طنابهای اپیتلیالی گنادها (لوله های سمینفر آینده در بیضه و فولیکول ها در تخمدان) است به طوری که توزیع فراوان و مشابه کربوهیدرات ها در گناد های اولیه در هر دو جنس، عدم تمایز جنسی آن ها را تأیید می کند. تغییرات کربوهیدرات ها با تمایز در گنادها ظهور پیدا می کند که می تواند موید نقش کلیدی این ترکیبات در تمایز گناد ها باشد^(۱۷، ۱۸). نتایج مطالعات متعددی که در زمینه پیدایش، حضور و ناپدید شدن

واکنش با لکتین PNA، ماتریکس خارج سلولی (M) در مقایسه با روز چهاردهم در ناحیه خلفی گناد واکنش بیشتری را نشان داد ($p < 0.05$). در این مرحله تکاملی PGCs در دسته های سلولی منظم قرار گرفته اند که با لکتین مذکور واکنش متوسطی را نشان دادند ($p < 0.05$) و اپی تلیوم سطحی گناد که به صورت چند لایه سلولی مشخص شده اند واکنش متوسطی را نشان دادند که نسبت به روز های دوازدهم و چهاردهم افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0.05$). در مزانشیم زیرین اپی تلیوم واکنشی ضعیفی قابل مشاهده بود. سایر سلول های گنادی که به صورت پراکنده در گناد ها وجود داشتند واکنشی را نشان ندادند (در شکل 3-C).

بحث و نتیجه گیری

تشکیل گنادها حاصل مراحل پیچیده تکاملی است، به طوری که ابتدا گنادها به صورت یک زوج ستیغ تناسلی طولی که حاصل تکثیر اپیتلیوم سلومی و متراکم شدن مزانشیم زیرین آن است شکل می گیرند. سپس سلول های جنسی اولیه PGCs با منشا اپی بلاستی، از دیواره کیسه زرده و از طریق مزانتر پشته به سمت ستیغ های تناسلی مهاجرت نموده و وارد آن می شوند و تمایز گنادهای اولیه را به تخمدان و بیضه القاء می کنند^(۱). سلول های جنسی اولیه علاوه بر این که اطلاعات ژنتیکی را از یک نسل به نسل بعد منتقل

شکل ۳: فوتومیکروگراف های مربوط به گناد در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته و از آسین بلو (pH=2.5) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.



شکل 3-A: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۲ روزه رت که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته است همانطور که در تصویر ملاحظه می گردد فقط سلول های سطحی گناد (SE) و ماتریکس خارج سلولی با لکتین مذکور واکنش بسیار ضعیفی را نشان دادند. (Scale bar = 25µm)

شکل 3-B: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۴ روزه رت را نشان می دهد که PGCs بصورت تجمعات سلولی دیده می شوند (P) و واکنش نسبتاً ضعیفی در آنها قابل مشاهده است و سلول های دیگر گناد، ماتریکس خارج سلولی و اپیتلیوم سطحی واکنشی را نشان ندادند. (Scale bar = 25µm)

شکل 3-C: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۶ روزه رت را نشان می دهد که PGCs در دسته های سلولی منظم (P) با لکتین مذکور واکنشی متوسط، ماتریکس خارج سلولی واکنشی ضعیف را نشان می دهند در حالیکه سایر سلول های گنادی واکنشی بروز ندادند. در سلول های اپی تلیوم سطحی (SE) واکنشی متوسط و مزانشیم زیرین اپی تلیوم نیز واکنش ضعیفی دیده می شود. (Scale bar = 25µm)

دو جنس متفاوت است^(۲۱) در ادامه روند تکاملی گناد ها اندکی قبل و یا با رسیدن PGCs به ستیغ های گنادی و القای تشکیل طناب های جنسی اولیه، نقش این سلول ها در تکامل گناد ها مشخص تر می گردد. این طناب ها که حاصل تزاید سلول های اپیتلیال به مزانشیم زیرین آن است در هر دو جنس مونث و مذکر رخ می دهد و افتراق دو جنس از یکدیگر در این مرحله از تکامل در مقاطع میکروسکوپی غیر ممکن است^(۱۵) القای تشکیل طناب های جنسی اولیه مستلزم بیان مولکول های ویژه در سطح PGCs هاست. در این راستا نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در روز شانزدهم جنینی PGCs در دسته های سلولی منظم قرار گرفته و با لکتین های LTA و MPA واکنش ضعیفی را نشان دادند و با لکتین PNA واکنش شدیدتری را ظاهر ساختند که این مشاهدات می تواند تأکیدی بر نقش قند های انتهایی D-Gal-(β1→3)-D-GalNAc, L-fuc(α1→4)GlcNAc و Gal-(β1→3) GalNAc در تشکیل طناب های جنسی اولیه و در نتیجه تکامل گناد ها باشد. در ادامه فرایند تکامل در جنین هایی که از نظر جنسیت مذکر باشند (PGCs حاوی ترکیب کروموزومی XY) تزاید طناب های جنسی اولیه ادامه داشته و طناب های مدولاری یا بیضه ای را تشکیل می دهند. در حالی که در جنین هایی که از نظر جنسیت مونث هستند (PGCs حاوی ترکیب کروموزومی XX) تزاید طناب های جنسی اولیه به دسته های سلولی نامنظمی در ناحیه مدولا تفکیک می شوند که بعداً از بین می روند و با ادامه تزاید سلول های سطحی در گنادهای مونث، طناب های جنسی ثانویه (Cortical) در زیر اپی تلیوم سطحی را تشکیل می دهند^(۱). با توجه به این روند تکاملی، بررسی مقاطع میکروسکوپی گناد های جنین های شانزده روزه نشان داد که برخی از PGCs که به صورت توده های سلولی در ناحیه مدولای گناد قرار داشتند و به صورت طناب سلولی آرایش یافته بودند واکنش نسبتاً شدیدی را با لکتین MPA نشان دادند. این توده های سلولی با لکتین های LTA و PNA واکنش ضعیفی را نشان دادند که این می تواند به دلیل لزوم ایفای نقش قندهای انتهایی خاص در مراحل متفاوت تمایزات جنینی باشد. تعداد لایه های سلولی اپیتلیوم سطحی گنادهای اولیه که در تشکیل ستیغ های تناسلی و سپس در شکل گیری و تمایز طناب های جنسی اولیه و ثانویه شرکت

قندهای انتهایی طی تکامل جنینی و اهمیت حضور این مولکول ها انجام گرفته است نشان می دهد که هر یک از ارگان ها در مراحل مختلف تکاملی خود، الگوی ویژه ای از نظر زمان ظهور، نوع قند های انتهایی و تغییرات آن از خود نشان می دهند. در بیضه های در حال تکامل در جنین های رت یک الگوی تکاملی آشکار در سلول های لیدینگ و سلول های سرتولی و اسپرماتوزنیک (مانند سلول های در حال شکل گیری آکروزوم) یافت شده است. هم چنین تمایز اپیدیدیم با افزایش باند شونده با لکتین در ناحیه راسی گلژی، سطح راسی سلول ها و ترشحات داخل لوله ای (قبل از ورود اسپرم) مشخص شده است^(۱۹). نتایج تحقیقاتی که با استفاده از لکتین های نشاندار با مواد فلوروسنت در بیضه رت انجام شده است نشان می دهد که بیضه رت غنی از گلیکوکونژوگیت های متنوع است که تغییر در توزیع آن ها در طی تکامل واضح است^(۲۰).

با توجه به این که تکامل گناد ها در رت از روز دهم جنینی به صورت دو ستیغ تناسلی ظاهر می شود و سلول های جنسی اولیه (PGCs) از روز دوازدهم از دیواره کیسه زرده به طرف ستیغ های گنادی شروع به مهاجرت می نمایند، احتمالاً در روز دوازدهم هنوز PGCs در گنادهای در حال تکامل وجود ندارد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز موید این موضوع بوده به طوری که در این روز در بررسی مقاطع میکروسکوپی هیچ کدام از لکتین های MPA, LTA و PNA با سلولی که واجد ویژگی های PGCs باشد واکنشی مشاهده نگردید.

بیش تر سلول های جنسی اولیه (PGCs) در روز سیزدهم جنینی، و تقریباً همه آن ها در روز چهاردهم به ستیغ های گنادی می رسند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که در روز چهاردهم جنینی PGCs با لکتین LTA و MPA واکنشی را نشان ندادند در حالی که لکتین PNA با PGCs که به صورت گروه های سلولی دیده می شوند واکنش نسبتاً ضعیفی را بروز دادند. عدم واکنش این سلول ها با LTA و MPA و واکنش ضعیف آنها با PNA که در واقع به ترتیب نشان دهنده عدم بیان قند D-Gal-(β1→3)-D-GalNAc و L-fuc(α1→4)GlcNAc می باشد می تواند موید بیان تنظیم شده این قندها از نظر تکاملی باشد. به علاوه واکنش لکتین ها با PGCs وابسته به جنس بوده و بیان قندهای انتهایی در PGCs

Galactosyltransferase. Biol Reprod ; 2004. 71(6):1822-7.

3. Fröjdman K, Malmi R, Pelliniemi LJ. Lectin-binding carbohydrate in sexual differentiation of rat male and female gonads. Histo Chem; 1992. 97(6):469-77.

4. Fröjdman K, Ekblom P, Sorokin L, Yagi A, Pelliniemi LJ. Differential distribution of laminin chains in the development and sex differentiation of mouse internal genitalia. Int J Dev Biol ; 1995. 39(2):335-44.

5. Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryo. Micron; 2001. 32(4):427-38.

6-Lodish HF. Molecular Cell Biology. 6th ed. New York: Freeman ; 2008. p. 987-8.

7. Hassanzadeh Taheri M.M, Nikraves M.R, Jalali M, Fazel A.R Ebrahimzadeh bideskan A.R. Distribution of Specific Glycoconjugate in Early Mouse Embryonic Notochord and Paraxial Mesenchyme. Iran Biomed J; 2005. 9(1): 21-26.

8. Eggence I, Fenderson BA, Toyokuni T, Hakomori S. A role of carbohydrate-carbohydrate interaction in the process of specific cell recognition during embryogenesis and organogenesis: a preliminary note. Biochem Biophys Res Commun; 1989. 158(3):913-20.

9. Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera. Anat Rec; 1990. 228(2):177-84.

10. Zhang L, Tran DT, Ten Hagen KG. An O-glycosyltransferase promotes cell adhesion during development by influencing secretion of an extracellular matrix integrin ligand. J Biol Chem ; 2010. 285(25):19491-501.

11. Qasba PK. Involvement of sugars in protein-protein interaction. Carbohydr Polym; 2000. 41:293-309.

12. Hewitson TD, Darby IA. Histology Protocols. New York: Humana Press; 2008. p. 103-14.

13. Wong SE, Winbanks CE, Samuel CS, Hewitson TD. Lectin histochemistry for light and electron microscopy. Methods Mol

می کند در حین تکامل جنینی در دو جنس نر و ماده متفاوت است به طوری که در جنس نر معمولاً به صورت یک لایه و در جنس ماده به علت شرکت آن در تشکیل طناب های جنسی ثانویه به صورت چند لایه دیده می شود که از این ویژگی می توان در تشخیص نوع گناد (جنسیت) در این مرحله از تکامل جنینی استفاده نمود^(۱۵) و هم چنین علت تعداد متفاوت لایه های سلولی اپیتلیوم سطحی را در نمونه های مختلف پژوهش حاضر تبیین نمود. از طرف دیگر واکنش متفاوت این سلول ها با لکترین های مختلف در مراحل تکاملی مورد بررسی به ویژه واکنش قابل ملاحظه آن ها در روز شانزدهم جنینی نیز نشان می دهد که بیان مولکول های قندی از نظر تکاملی تنظیم شده است.

بر اساس یافته های این پژوهش می توان نتیجه گرفت که الگوی بیان و تغییرات گلیکوکونژوگیت ها با قند های انتهایی- L-Fuc ($\alpha 1 \rightarrow 4$)GlcNAc, Gal($\beta 1$ -GalNAC و 3)GalNAC در طی گنادوژنز تنظیم شده است و تعیین این الگو می تواند پایه ای برای مطالعات آینده و مقایسه آن با حالت های پاتولوژیک و ترانولوژیک باشد.

تشکر و تقدیر

پژوهش حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۳۰۲۶۶۵/۸۸ مورخ ۱۳۸۸/۱۰/۲۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است که به این وسیله از آن معاونت محترم و هم چنین خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی مشهد تشکر و تقدیر می گردد.

فهرست منابع

1. Sadler TW. Longman's Medical Embryology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin; 2009. p. 246-50.

2. Bandyopadhyay S, Banerjee S, Pal AK, Goswami SK, Chakravarty B, Kabir SN. Primordial Germ Cell Migration in the Rat: Preliminary Evidence for a Role of

Biol ;2010. 611:103-14.

14-Ahi M, Zamansoltani F, Hassanzadeh Taheri M.M, Ebrahimzadeh bideskan A.R.The role of GalNac terminal sugar on adrenal gland development. Adv Bio Res; 2007. 1(2): 34-39.

15. Armengol C, Carretero A, Nacher V, Ruberte J, Navarro M.Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation.Anat J;2007. 210(1):98-111.

16. Mina M, Kollar EJ, Bishop JA, Rohrbach DH. Interaction between The Neural Crest and Extracellular Matrix Proteins in Craniofacial Skeletogenesis.Crit Rev Oral Biol Med ;1990 1(2):79-83.

17. Simon-Assmann P, Lefebvre O, Bellissent- Waydelich A, Olsen J, Orian-Rousseau V, De Arcangelis A.The Laminins: Role in Intestinal Morphogenesis and Differentiation.Ann N Y Acad Sci; 1998. 859:46-64.

18. Lehninger AL, Cox MM,Nelson DL. Lehninger principles of biochemistry.5nd ed. New York: W.H. Freeman; 2008. P. 252-8.

19. Arya M, Vanha-Perttula T.Postnatal development of lectin-binding pattern in the rat testis and epididymis.Acta Anat (Basel); 1986. 127(2):100-9.

20. Malmi R, Fröjdman K, Söderström O.Differentiation-relate changes in the distribution of glycoconjugates in rat testis.Histochemistry; 1990. 94: 387-395.

21. Alonso E, Sáez FJ, Madrid JF, Hernández.Lectin Histochemistry Shows Fucosylated Glycoconjugates in the Primordial Germ Cells of Xenopus Embryos.J Histochem Cytochem;2003. 51(2):239-43.

Study of glycoconjugates terminal sugars during gonadogenesis in rat by lectin histochemical method

F. Nikmard, MSc student, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: NikmardF@mums.ac.ir

***A. Ebrahimzadeh Bideskan, PhD.** Assistant professor of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (*Corresponding author). Email: Ebrahimzadehba@mums.ac.ir

A. Mahmoodian, PhD. Assistant professor of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: MahmodianA@mums.ac.ir

E. Mohammadzadeh, MSc student, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: MohammadzadehE871@mums.ac.ir

A. Fazel, PhD. Professor of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: FazelA@mums.ac.ir

Abstract

Introduction: Gonadogenesis is a complex developmental process which is regulated by molecular interactions such as cell surface and extracellular matrix (ECM) Glycoconjugates terminal sugars. The aim of this study was to determine Glycoconjugates terminal sugars expressions and changes during Gonadogenesis in Rat using Lectin histochemical technique.

Methods: To determine of glycoconjugate terminal sugars by Lectin histochemistry method, thirty Wistar Rat embryos at different stages from days 12 to 16 of gestation were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut in to 5µm thickness sections serially. The sections were incubated with different HRP-lectins from Lotus tetragonolobus (LTA), Maclura pomifera (MPA) and Arachis hypogaea or Peanut (PNA), that are specific for terminal sugars L-Fuc (α 2-4)GlcNAc, Gal(β 1-3)GalNAc and D-Gal(β 1-3)DGalNAc respectively. On the basis of colorimetry data that was determined by blind's method, sections were graded and SPSS statistic soft ware and kruskal Wallis tests were used for comparing different embryonic stages.

Results: Our finding showed that LTA did not react with developing gonads at gestational day 12(E₁₂). LTA reactivity was found in extracellular matrix (ECM) of developing gonads from E₁₄ through E₁₆ (P<0.05) and PGC_s as well as surface epithelium at E₁₆ (P<0.05). Surface epithelium were reacted with MPA from E₁₂ to E₁₄ and increased LTA reactivity at E₁₆ (P<0.05). ECM was reacted with MPA at E₁₄ and diminished at E₁₆ (P<0.05). LTA reactivity was found in PGC_s at E₁₆. PNA did not react with developing gonads at gestational day 12(E₁₂) but its reaction was started with PGC_s from E₁₄ and increased to E₁₆ (P<0.05). In addition, PNA reactivity was started with ECM and surface epithelium from E₁₄ and increased at E₁₆ significantly (P<0.05).

Conclusion: According to our result, it is concluded that the expression and changes of glycoconjugates with terminal sugars L-Fuc (α 2-4) GlcNAc, and D-Gal (β 1-3) DGalNAc are regulated developmentally during rat gonadogenesis.

Keywords: Gonadogenesis, Development, Glycoconjugates, Lectin, L-Fucos, N-Accetylc Galactose.